製品コード CY505S
製品コード CY505A

研究用

TaKaRa

Cycleave®PCR Starter Kit
(製品コード CY505S)
Cycleave®PCR Reaction Mix
(製品コード CY505A)

説明書

v201311Da

CycleavePCR Reaction Mix は、検出にサイクリングプローブを用いるリアルタイム PCR 専用試薬です。2 ×濃度のプレミックスタイプ試薬で、サイクリングプローブ法に最適化されたバッファーと抗 *Taq* 抗体を利用したホットスタート PCR 用酵素 *TaKaRa Ex Taq* HS をあらかじめ含んでおり、反応液の調製が簡単です。
迅速性と定量性に優れたリアルタイム PCR 法と非常に特異性の高い検出法であるサイクリングプローブ法との組み合わせにより、ターゲットの検出や定量、1 塩基多型の検出などを正確かつ簡便に行うことができます。
CycleavePCR Starter Kit には、CycleavePCR Reaction Mix に加え、試薬の反応性を確認するための Positive Control が含まれています。反応系構築後は、コストパフォーマンスの高い CycleavePCR Reaction Mix がお勧めです。
タカラバイオウェブサイトで公開している SNP 検出用（1 塩基置換）プライマー・サイクリングプローブ設計／注文システム「CycleavePCR Assay Designer（SNPs）」のプライマーとサイクリングプローブで解析を行う際には、CycleavePCR Starter Kit（製品コード CY505S）または CycleavePCR Reaction Mix（製品コード CY505A/B）を組み合わせてご使用ください。

注： TaqMan® プローブ＊を用いたリアルタイム PCR には *Premix Ex Taq* (Probe qPCR)（製品コード RR390A/B）を、SYBR® Green I を用いたリアルタイム PCR には SYBR® *Premix Ex Taq* (Tli RNaseH Plus)（製品コード RR420S/A/B）や SYBR® *Premix Ex Taq* II (Tli RNaseH Plus)（製品コード RR820S/A/B）を使用してください。

＊：SYBR® は Molecular Probes Inc. の、TaqMan® は Roche Diagnostics 社の登録商標です。

本製品の適応機種

- Thermal Cycler Dice Real Time System *II*（製品コード TP900/TP960）
- Thermal Cycler Dice Real Time System *Lite*（製品コード TP700/TP760 など）
- Smart Cycler® System/Smart Cycler® II System＊（Cepheid 社）
- Applied Biosystems 7500/7500 Fast Real-Time PCR System、StepOnePlus™ Real-Time PCR System（Life Technologies 社）
- LightCycler®（Roche Diagnostics 社）

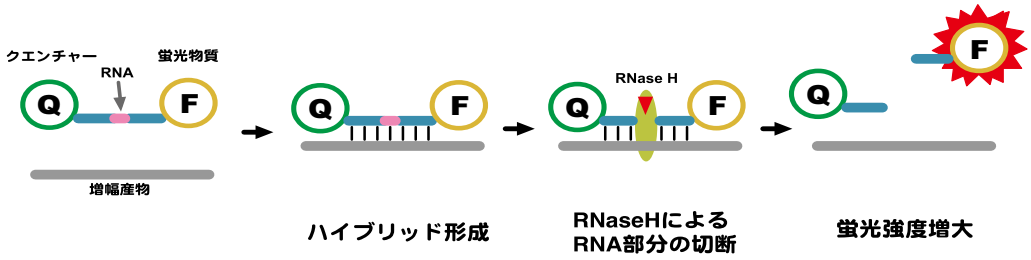
＊：Smart Cycler® は Cepheid 社の登録商標です。

I. 原理

CycleavePCR Reaction Mix は、*TaKaRa Ex Taq* HS による PCR 増幅を行い、PCR 増幅産物をサイクリングプローブ法によりリアルタイムでモニタリングします。

1. PCR
   PCR 法は微量 DNA から目的の遺伝子断片のみを増幅させる技術です。DNA の熱変性、プライマーのアニーリング、DNA ポリメラーゼによる伸長反応の 3 ステップからなる工程を 1 サイクルとし、これを繰り返すことで、短時間のうちに目的遺伝子断片を 100 万倍に増幅させることができます。
   本製品では、増幅にホットスタート PCR 用酵素 *TaKaRa Ex Taq* HS を使用しているため、反応液調製時などサイクル前のミスプライミングやプライマーダイマーに由来する非特異的増幅を防ぐことができ、高感度の検出が可能になります。

2. サイクリングプローブ法
   サイクリングプローブ法とは、RNA と DNA からなるキメラプローブと RNase H の組み合わせによる高感度な検出法で、増幅中や増幅後の遺伝子断片の特定配列を効率良く検出することができます。その検出原理を次の図に示します。



プローブは、RNA 部を挟んで一方が蛍光物質で、他方はその蛍光物質の発する蛍光を消光する物質（クエンチャー）で標識されています。インタクトな状態ではクエンチングにより蛍光を発することはありませんが、増幅産物中の相補的な配列とハイブリッドを形成した後に RNase H により RNA 部分が切断されると強い蛍光を発するようになります。この蛍光強度を測定することで、増幅産物量をモニターすることができます。
プローブの RNA 部分もしくは RNA 部分の 1 塩基 5' 側の塩基がミスマッチの場合には RNase H による切断がおこらないことを利用して、1 塩基の違いを識別する特異性の高い検出が可能です。

II. キットの内容

CycleavePCR Starter Kit（製品コード CY505S）[80 回（25 μl 反応系）]

CycleavePCR Reaction Mix（2 × conc.）＊1	1 ml
ROX Reference Dye（50 × conc.）＊2	200 μl
ROX Reference Dye II（50 × conc.）＊2	200 μl
Positive Control＊3	10 μl
Positive Control Primer Mix（10 μM each）＊3	10 μl
Positive Control Probe（FAM/TAMRA）（25 × conc.）＊3、4	10 μl
dH_2O	1 ml

CycleavePCR Reaction Mix（製品コード CY505A）[400 回（25 μl 反応系）]

CycleavePCR Reaction Mix（2 × conc.）＊1	1 ml × 5
ROX Reference Dye（50 × conc.）＊2	200 μl
ROX Reference Dye II（50 × conc.）＊2	200 μl

＊1：*TaKaRa Ex Taq* HS、dNTP Mixture、Mg^{2+}、Tli RNaseH II を含みます。

＊2：Life Technologies 社製リアルタイム PCR 装置など、ウェル間の蛍光シグナルの補正を行う装置で解析する場合に使用します。**ROX 標識プローブを用いる場合は、使用しないでください。**

◆ ROX Reference Dye を添加する機種
- StepOnePlus™ Real-Time PCR System（Life Technologies 社）

◆ ROX Reference Dye II を添加する機種
- Applied Biosystems 7500/7500 Fast Real-Time PCR System（Life Technologies 社）

◆添加の必要がない機種
- Thermal Cycler Dice Real Time System シリーズ（製品コード TP900 など）
- Smart Cycler® System/Smart Cycler® II System（Cepheid 社）
- LightCycler®（Roche Diagnostics 社）

＊3：試薬の反応性を確認するためのコントロール実験用です。

＊4：蛍光標識プローブにつき遮光に留意してください。

本製品以外に必要な試薬、機器（主なもの）

1. リアルタイム PCR 用遺伝子増幅システム（authorized instruments）
2. 専用反応チューブあるいはプレート
3. PCR 用プライマー＊
4. サイクリングプローブ＊
5. 滅菌蒸留水
6. マイクロピペットおよびチップ（オートクレーブ処理したもの）

＊：プライマーおよびサイクリングプローブの設計方法は、「VIII. プライマー・プローブの設計について」をご参照ください。プライマーおよびサイクリングプローブのカスタム設計・合成サービスも行っております。また、SNPs 解析を行う場合は、SNP 検出用（1 塩基置換）プライマー・サイクリングプローブ設計／注文システム「CycleavePCR Assay Designer（SNPs）」をご利用ください。

III. 保存

－ 20℃

IV. 特長

1. リアルタイム PCR とサイクリングプローブ法により、遺伝子の検出、定量を迅速かつ正確に行うことが可能です。1 塩基の違いを識別する SNP 検出系を構築することも可能です。

2. CycleavePCR Reaction Mix は、2×conc. のプレミックス試薬です。プライマー、サイクリングプローブ、template と滅菌蒸留水を加えるだけでリアルタイム PCR を行うことができます。

3. PCR には、ホットスタート PCR 用酵素 *TaKaRa Ex Taq* HS を用いています。バッファー系はリアルタイム PCR 用に至適化されているため、増幅効率が良く、高感度な検出ができます。

V. 操作上の注意

本製品を使用する場合の注意事項です。使用前に必ずお読みください。

1. 使用時には、泡立てないよう緩やかに転倒混合し、試薬を均一にしてから使用してください。
   試薬組成に偏りがあると十分な反応性が得られなくなります。ボルテックスによる混合は行わないでください。

2. 反応液調製時には、試薬を氷上に置いてください。

3. 反応液の調製、分注を行うときは必ず新しいディスポーザブルチップを用い、サンプル間のコンタミネーションを極力防止してください。

VI. 操作

＜ Thermal Cycler Dice Real Time System *II* を用いる場合の操作方法 ＞

1. 下記に示す PCR 反応液を調製する。ROX Reference Dye は不要

＜ 1 反応あたり ＞

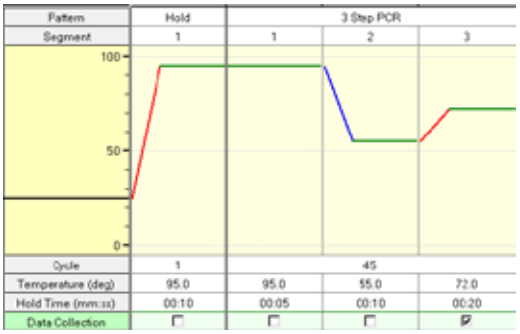
試薬	使用量	最終濃度	
CycleavePCR Reaction Mix（2×conc.）	12.5 μl	1×	
PCR Forward Primer（10 μM）	0.5 μl	0.2 μM	
PCR Reverse Primer（10 μM）	0.5 μl	0.2 μM	
サイクリングプローブ（5 μM）	1 μl	0.2 μM	＊1
template（<100 ng）	1 μl		＊2
dH_2O（滅菌蒸留水）	9.5 μl		
total	25 μl		

＊1：サイクリングプローブは通常 0.2 μM で使用しますが、使用量はシグナル強度に応じて調整してください。Thermal Cycler Dice Real Time System *II* では、Result/Analysis Data を Amplification Plots に設定し、Fluorescence を Raw で表示した時のバックグラウンド（ベースラインのシグナル強度）が 10,000 以下であり、最終蛍光強度がベースラインより 5,000 以上 30,000 以下程度となる濃度に調整して使用してください。

＊2：1 μl 以上の量の template を添加することもできます。その場合には添加量に応じて dH_2O の量を調整してください。
また、逆転写反応により得られた cDNA（RT 反応液）を template として添加する場合は、PCR 反応液容量の 10%以下になるように添加してください。

2. 反応チューブを遠心機で軽く遠心後、リアルタイム PCR 装置にセットし、反応を開始する。

PCR 反応は、下記の 3 Step PCR 標準プロトコールで行うことをお勧めします。
まずは、このプロトコールを試し、必要に応じて PCR 条件を至適化してください。
10 ページの「実験条件の選び方」をご参照ください。



3 Step PCR 標準プロトコール

Hold（初期変性）
Cycle： 1
95℃　10 ～ 30 秒

3 Step PCR
Cycle：45
95℃　5 秒
55℃　10 秒
72℃　20 秒

【 使用上の注意 】

本製品に使用している *TaKaRa Ex Taq* HS はポリメラーゼ活性を抑制する抗 *Taq* 抗体を利用したホットスタート PCR 用酵素です。他社の化学修飾タイプのホットスタート PCR 酵素で必要な PCR 反応前の 95℃（5 ～）15 分の活性化ステップは行わないでください。必要以上の熱処理を加えると酵素活性が低下し、増幅効率、定量精度に影響を及ぼす傾向があります。PCR 反応前に鋳型の初期変性を行う場合でも、通常 95℃ 30 秒で十分です。

3. 反応終了後、増幅曲線を確認し、定量を行う場合は検量線を作成する。
解析方法は、Thermal Cycler Dice Real Time System *II* の取扱説明書を参照してください。

＜ Smart Cycler® II System を用いる場合の操作方法＞

1. 下記に示す PCR 反応液を調製する。ROX Reference Dye は不要

＜ 1 反応あたり ＞

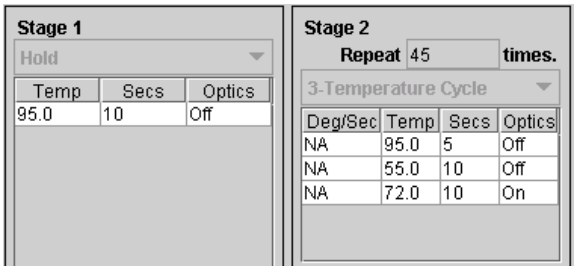
試薬	使用量	最終濃度	
CycleavePCR Reaction Mix（2×conc.）	12.5 μl	1×	
PCR Forward Primer（10 μM）	0.5 μl	0.2 μM	
PCR Reverse Primer（10 μM）	0.5 μl	0.2 μM	
サイクリングプローブ（5 μM）	1 μl	0.2 μM	＊1
template（<100 ng）	1 μl		＊2
dH_2O（滅菌蒸留水）	9.5 μl		
total	25 μl		

＊ 1：サイクリングプローブは通常 0.2 μM で使用しますが、使用量はシグナル強度に応じて調整してください。Smart Cycler® では、蛍光強度が 300 ～ 500 程度となる濃度に調整して使用してください。

＊ 2：1 μl 以上の量の template を添加することもできます。その場合には添加量に応じて dH_2O の量を調整してください。
また、逆転写反応により得られた cDNA（RT 反応液）を template として添加する場合は、PCR 反応液容量の 10%以下になるように添加してください。

2. 反応チューブを Smart Cycler® 用遠心機で軽く遠心後、Smart Cycler® にセットし、反応を開始する。

PCR 反応は、下記の 3 Step PCR 標準プロトコールで行うことをお勧めします。
まずは、このプロトコールを試し、必要に応じて PCR 条件を至適化してください。
10 ページの「実験条件の選び方」をご参照ください。



3 Step PCR 標準プロトコール

Hold（初期変性）
Cycle： 1
95℃　10 ～ 30 秒

3 Step PCR
Cycle：45
95℃　5 秒
55℃　10 秒
72℃　10 ～ 15 秒

【 使用上の注意 】

本製品に使用している *TaKaRa Ex Taq* HS はポリメラーゼ活性を抑制する抗 *Taq* 抗体を利用したホットスタート PCR 用酵素です。他社の化学修飾タイプのホットスタート PCR 酵素で必要な PCR 反応前の 95℃（5 ～）15 分の活性化ステップは行わないでください。必要以上の熱処理を加えると酵素活性が低下し、増幅効率、定量精度に影響を及ぼす傾向があります。PCR 反応前に鋳型の初期変性を行う場合でも、通常 95℃ 30 秒で十分です。

3. 反応終了後、増幅曲線を確認し、定量を行う場合は検量線を作成する。
解析方法は、Smart Cycler® System の取扱説明書をご参照ください。

＜ Applied Biosystems 7500 Fast Real-Time PCR System および StepOnePlus™ Real-Time PCR System を用いる場合の操作方法 ＞

注：各装置の取扱説明書に従って操作してください。

1. 下記に示す PCR 反応液を調製する。

＜ 1 反応あたり ＞

試薬	使用量	最終濃度
CycleavePCR Reaction Mix（2×conc.）	10 μl	1×
PCR Forward Primer（10 μM）	0.4 μl	0.2 μM
PCR Reverse Primer（10 μM）	0.4 μl	0.2 μM
サイクリングプローブ（5 μM）	0.8 μl	0.2 μM ＊1
ROX Reference Dye（50×conc.）or Dye II（50×conc.）＊2	0.4 μl	1×
template（<100 ng）	1.0 μl	＊3
dH_2O（滅菌蒸留水）	7.0 μl	
total	20 μl	

＊ 1：サイクリングプローブは通常 0.2 μM で使用しますが、使用量はシグナル強度に応じて調整してください。

＊ 2：ROX Reference Dye II（50×）は、ROX Reference Dye（50×）より濃度が低く設定されています。StepOnePlus™ で解析する場合には ROX Reference Dye（50×）を、7500 Real-Time PCR System および 7500 Fast Real-Time PCR System で解析する場合には ROX Reference Dye II（50×）の使用を推奨します。

注： ROX 標識プローブを使用する場合は、ROX Reference Dye を使用しないでください。

＊ 3：1 μl 以上の量の template を添加することもできます。その場合には添加量に応じて dH_2O の量を調整してください。
また、逆転写反応により得られた cDNA（RT 反応液）を template として添加する場合は、PCR 反応液容量の 10%以下になるように添加してください。

2. 反応チューブを遠心機で軽く遠心後、リアルタイム PCR 装置にセットし、反応を開始する。
Experiment Properties にて Quantification-Standard を選択し、TaqMan Reagents または Others を選択する。（Others を選択した場合は、Include Melt Curve のチェックを外す。）Plate Set Up の Define Target の Reporter および Quencher を標識した蛍光に設定する。Plate Layout の Passive Reference は ROX に設定する。

注： ROX 標識プローブを使用する場合は、ROX Reference Dye を添加しないで Passive Reference を none に設定してください。
Quencher が Eclipse 標識の場合は、Quencher を none と設定してください。

PCR 反応は、次の 3 Step PCR 標準プロトコールで行うことをお勧めします。
まずは、このプロトコールを試し、必要に応じて PCR 条件を至適化してください。
10 ページの「実験条件の選び方」をご参照ください。

3 Step PCR 標準プロトコール

Hold（初期変性）
Cycle： 1
95℃　10 ～ 30 秒

3 Step PCR
Cycle：45
95℃　5 秒
55℃　10 秒
72℃　20 ～ 25 秒＊

＊：StepOnePlus™ では 20 秒に、7500 Fast では 25 秒に設定する。

【使用上の注意】

本製品に使用している *TaKaRa Ex Taq* HS はポリメラーゼ活性を抑制する抗 *Taq* 抗体を利用したホットスタート PCR 用酵素です。他社の化学修飾タイプのホットスタート PCR 酵素で必要な PCR 反応前の 95℃（5 ～）15 分の活性化ステップは行わないでください。必要以上の熱処理を加えると酵素活性が低下し、増幅効率、定量精度に影響を及ぼす傾向があります。PCR 反応前に鋳型の初期変性を行う場合でも、通常 95℃ 30 秒で十分です。

3. 反応終了後、増幅曲線を確認し、定量を行う場合は検量線を作成する。
解析方法は、リアルタイム PCR 装置の取扱説明書をご参照ください。

＜ LightCycler® を用いる場合の操作方法＞

注：LightCycler®（Roche Diagnostics 社）の取扱説明書に従って操作してください。

1. 下記に示す PCR 反応液を調製する。ROX Reference Dye は不要

＜ 1 反応あたり ＞

試薬	使用量	最終濃度	
CycleavePCR Reaction Mix（2×conc.）	10 μl	1×	
PCR Forward Primer（10 μM）	0.4 μl	0.2 μM	
PCR Reverse Primer（10 μM）	0.4 μl	0.2 μM	
サイクリングプローブ（5 μM）	0.8 μl	0.2 μM	＊1
template（< 100ng）	1 μl		＊2
dH_2O（滅菌蒸留水）	7.4 μl		
total	20 μl		

＊ 1：サイクリングプローブは通常 0.2 μM で使用しますが、使用量はシグナル強度に応じて調整してください。

＊ 2：1 μl 以上の量の template を添加することもできます。その場合には添加量に応じて dH_2O の量を調整してください。
また、逆転写反応により得られた cDNA（RT 反応液）を template として添加する場合は、PCR 反応液容量の 10%以下になるように添加してください。

2. PCR キャピラリーを遠心機で軽く遠心後、LightCycler® にセットし、反応を開始する。
PCR 反応は、下記の 3 Step PCR 標準プロトコールで行うことをお勧めします。
まずは、このプロトコールを試し、必要に応じて PCR 条件を至適化してください。
10 ページの「実験条件の選び方」をご参照ください。

3 Step PCR 標準プロトコール

Hold（初期変性）
Cycle： 1
95℃　10 ～ 30 秒

3 Step PCR
Cycle：45
95℃　5 秒
55℃　10 秒
72℃　10 ～ 15 秒

【 使用上の注意 】

本製品に使用している *TaKaRa Ex Taq* HS はポリメラーゼ活性を抑制する抗 *Taq* 抗体を利用したホットスタート PCR 用酵素です。他社の化学修飾タイプのホットスタート PCR 酵素で必要な PCR 反応前の 95℃（5 ～）15 分の活性化ステップは行わないでください。必要以上の熱処理を加えると酵素活性が低下し、増幅効率、定量精度に影響を及ぼす傾向があります。PCR 反応前に鋳型の初期変性を行う場合でも、通常 95℃ 30 秒で十分です。

3. 反応終了後、増幅曲線を確認し、定量を行う場合は検量線を作成する。
解析方法は、LightCycler® の取扱説明書をご参照ください。

実験条件の選び方

推奨条件（3 Step PCR 標準プロトコール）で良好な反応性が得られない場合には、下記の要領でプライマー濃度や PCR 条件の検討を行ってください。

初期変性：95℃、10 ～ 30 秒

初期変性は通常 95℃、10 ～ 30 秒で十分です。環状プラスミドやゲノム DNA など変性しにくい鋳型でも、ほとんどの場合この条件で良好に反応できます。鋳型の状態によっては、95℃、1 ～ 2 分程度に延長することが可能ですが、時間が長すぎると酵素の失活を招く恐れがありますので、2 分以上の条件は推奨しません。

3 Step PCR：

変性：95℃、5 秒
リアルタイム PCR のターゲット増幅サイズは、一般的に 300 bp 以下であり、変性は 95℃で 3 ～ 10 秒で十分です。

アニーリング：55℃～ 62℃、10 ～ 20 秒
特異的検出ができていない場合は、アニーリング温度の至適化により、改善する場合があります。また、アニーリング時間を長くすると、増幅効率が良くなる場合があります。

伸長：72℃、～ 30 秒
増幅サイズが 300 bp の場合も、30 秒で十分です。
＊ Smart Cycler® の場合は 15 秒で十分です。
＊ Applied Biosystems 7500 Real-Time PCR System の場合は 34 秒に設定してください。

サイクル数：30 ～ 50 cycles

実験条件を選ぶ際には、反応特異性と増幅効率の両方を考慮して総合的に判断します。両方のバランスが取れた実験系では広い濃度範囲で正確な定量が可能です。

○ 増幅効率が高い実験系
・増幅産物がより早いサイクルで検出される（Ct 値が小さい）。
・PCR 増幅効率が高い（理論値である 100%に近い）。

【 プライマー濃度の検討 】

プライマー濃度と反応特異性および増幅効率の間には、以下のような関係があります。反応特異性を上げるにはプライマー濃度を下げ、増幅効率を上げるにはプライマー濃度を上げます。

プライマー濃度	低濃度（0.1 μM）	高濃度（1.0 μM）
反応特異性	高い ◀———	———▶ 低い
増幅効率	低い ◀———	———▶ 高い

【 PCR 条件の検討 】

○ 反応特異性を上げるには
アニーリング温度を上げると反応特異性が改善することがあります。増幅効率とのバランスを確認しながら、検討を行ってください。

○ 増幅効率を上げるには
伸長時間を延ばすことにより、増幅効率が改善することがあります。

VII. 実験例

Positive Control による CycleavePCR 反応の確認（Thermal Cycler Dice Real Time System 使用）

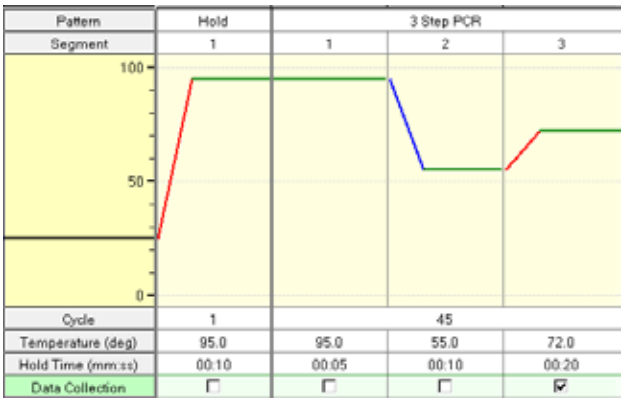
CycleavePCR Starter Kit に添付されている Positive Control で実験操作の確認を行うことができます。

1. 下記に示す PCR 反応液を調製する。

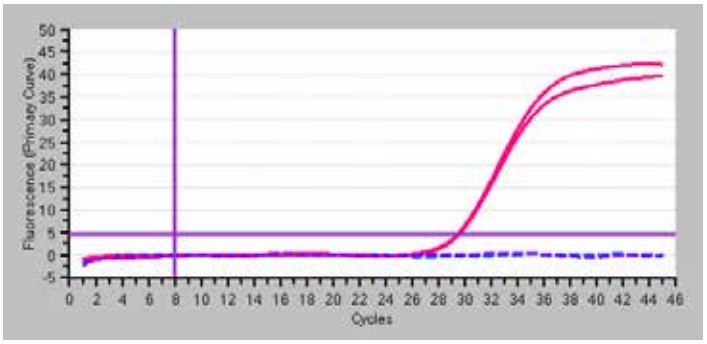
＜1 反応あたり＞

試薬	使用量	最終濃度
CycleavePCR Reaction Mix（2×conc.）	12.5 μl	1×
Positive Control Primer Mix（10 μM each）	1 μl	0.2 μM
Positive Control Probe（FAM/TAMRA）（25×conc.）	1 μl	1×
Positive Control	1 μl	
dH_2O（滅菌蒸留水）	9.5 μl	
total	25 μl	

2　反応条件は、下図のように設定する。



3. Positive Control 反応例
Positive Control を用いた反応では、下図のような結果が得られる。



——：PC
-------：NC

VIII. プライマー・プローブ設計について

1）SNPs 解析用プライマー・サイクリングプローブの設計について

タカラバイオウェブサイトで公開している【 CycleavePCR Assay Designer（SNPs）】をご利用ください。
CycleavePCR 用のプライマー・サイクリングプローブの設計には、いくつかの条件があります。【 CycleavePCR Assay Designer（SNPs）】には設計のノウハウを反映させたプログラムが搭載されており、目的遺伝子の塩基配列、検出対象塩基を指定するだけで、プライマー、プローブ候補を最大 3 種類設計し、配列、Tm 値、増幅サイズ等の情報を開示します。配列確認後はそのままシームレスに注文が可能です。

＜注意＞

- 目的遺伝子の配列によっては設計できない場合があります。
- 候補として提示されるプライマー・プローブは実験的な確認を行ったものではありませんので、反応性や特異性を保証するものではないことをご了承ください。

2）発現解析用プライマー・サイクリングプローブの設計について

タカラバイオウェブサイトで公開している【 CycleavePCR Assay Designer 】をご利用ください。
【 CycleavePCR Assay Designer 】は、お持ちのプライマー増幅領域内にサイクリングプローブに適したプローブを設計・オンライン注文するためのシステムです。
目的遺伝子の塩基配列、プライマー配列を指定するだけで、プローブ候補を最大 10 種類設計し、配列、Tm 値等の情報を開示します。配列確認後はそのままシームレスに注文が可能です。

＜注意＞

候補として提示されるプライマー・プローブは実験的な確認を行ったものではありませんので、反応性や特異性を保証するものではないことをご了承ください。

IX. Appendix

RT-PCR を行う場合

RT 反応には PrimeScript RT Master Mix (Perfect Real Time) (製品コード RR036A) の使用をお勧めします。本製品と組み合わせて使用することにより、信頼性の高い結果を得ることができます。
PrimeScript RT Master Mix (Perfect Real Time) は、Oligo dT Primer と Random 6mers の両プライマーがミックスされており、mRNA 全長にわたり効率よく cDNA が合成されます。なお、各プライマーを単独で用いる場合および Gene Specific Primer を用いる場合は、PrimeScript RT Reagent Kit (Perfect Real Time) (製品コード RR037A) の使用をお勧めします。

1. 下記に示す逆転写反応液を氷上で調製する。
   RNA サンプル以外のコンポーネントを必要な本数＋α分調製し、マイクロチューブに分注後、RNA サンプルを添加すると良い。

＜ 1 反応あたり ＞　RR036A を使用の場合

試薬	使用量	最終濃度
5×PrimeScript RT Master Mix (for Real Time)	2 μl	1×
total RNA		
RNase Free dH_2O	up to 10 μl	

＜ 1 反応あたり ＞　RR037A を使用の場合

試薬	使用量	最終濃度
5×PrimeScript Buffer (for Real Time)	2 μl	1×
PrimeScript RT Enzyme Mix I	0.5 μl	
Oligo dT Primer (50 μM) ＊1	0.5 μl	25 pmol
total RNA		
RNase Free dH_2O	up to 10 μl	

＊ 1：Random Primer や Gene Specific Primer を単独で用いる場合は下記の濃度で使用してください。

	使用量	添加量
Random 6mers (100 μM)	0.5 μl	50 pmol
Gene Specific Primer (2 μM)	0.5 μl	1 pmol

注： 逆転写反応は、必要に応じてスケールアップしてください。10 μl の反応液で逆転写できるのは、およそ 500 ng までの total RNA です。

2. 逆転写反応を行う。
   37℃、15 分＊2 (逆転写反応)
   85℃、5 秒 (逆転写酵素を熱失活させる)
   4℃

＊ 2：Gene Specific Primer を用いる場合、逆転写反応を 42℃、15 分で行ってください。PCR で非特異的な増幅が生じた場合には、逆転写温度を 50℃に変更すると改善される場合があります。

3. PCR 反応液に上記の RT 反応液 (cDNA) を添加する。
   CycleavePCR 反応液容量の 10% まで添加することができる。

X. 関連製品

Thermal Cycler Dice® Real Time System *II*（製品コード TP900/TP960）
Thermal Cycler Dice® Real Time System *Lite*（製品コード TP700/TP760）
Cycleave® human ALDH2 Typing Probe/Primer Set Ver.2（製品コード CY403）
PrimeScript® RT Master Mix (Perfect Real Time)（製品コード RR036A/B）
PrimeScript® RT reagent Kit (Perfect Real Time)（製品コード RR037A/B）

Cycleave®PCR Assay Designer (SNPs)
▶ http://www.takara-bio.co.jp/realtime_snps/
CycleavePCR Assay Designer
▶ http://www.takara-bio.co.jp/prt/primer/intro.htm

XI. 使用文献

サイクリングプローブを用いて SNP 検出を行った使用例です。

1）Esaki H, Noda K, Otsuki N, Kojima A, and Asai T (2004) *J. Microbiol. Methods* **58**(1), 131-4.
2）Kosaka T, Yatabe Y, Endoh H, and Yoshida K (2006) *Clin.Cancer Res*. **12**, 5764-5769.
3）Yatabe Y, Hida T, Horio Y, and Kosaka T (2006) *J. Mol. Diagn.* **8**, 335-341.
4）Suzuki Y, Saito R, Zaraket H, and Daoat C (2010) *J. Clin. Microbiol.* **48**, 57-63.

XI. 注意

- 本製品は研究用として販売しております。ヒト、動物への医療、臨床診断用には使用しないようご注意ください。また、食品、化粧品、家庭用品等として使用しないでください。
- タカラバイオの承認を得ずに製品の再販・譲渡、再販・譲渡のための改変、商用製品の製造に使用することは禁止されています。
- ライセンスに関する最新の情報は弊社ウェブカタログをご覧ください。
- 本説明書に記載されている会社名および商品名などは、各社の商号、または登録済みもしくは未登録の商標であり、これらは各所有者に帰属します。

NOTICE TO PURCHASER: LIMITED LICENSE

[L15] Hot Start PCR
Licensed under U.S. Patent No. 5.338,671 and 5,587,287, and corresponding patents in other countries.

[L52] Rox Reference Dye（Research Field）
Use of this product is covered by one or more of the following US patents and corresponding patent claims outside the US: 5,928,907. The purchase of this product includes a limited, non-transferable immunity from suit under the foregoing patent claims for using only this amount of product for the purchaser's own internal research. No right under any other patent claim and no right to perform commercial services of any kind, including without limitation reporting the results of purchaser's activities for a fee or other commercial consideration, is conveyed expressly, by implication, or by estoppel. This product is for research use only. Further information on purchasing licenses may be obtained by contacting the Director of Licensing, Applied Biosystems, 850 Lincoln Centre Drive, Foster City, California 94404, USA.

[M40] Thermostable RNase H
This product is covered by the claims of U.S. Patent No. 7,422,888 and its foreign counterpart patent claims.

[M46] PCR-Cycleave
This product is covered by the claims of Japanese Patent No. 4022522.

[M57] LA Technology
This product is covered by the claims 6-16 outside the U.S. corresponding to the expired U.S. Patent No. 5,436,149.

製品についての技術的なお問い合わせ先
TaKaRa テクニカルサポートライン
Tel 077-543-6116　Fax 077-543-1977
ホームページアドレス http://www.takara-bio.co.jp/

タカラバイオ株式会社

v201311Da